

تهیه کننده: حسین پیری

## آشنایی با اصول طیف سنجی «Spectrophotometry»

### نور :

شکلی از انرژی تشعشعی می باشد که متشکل از دو میدان الکتریکی و مغناطیسی می باشد. یعنی از جنس الکترومغناطیس می باشد. اشکال دیگر آن شامل اشعه گاما؛ اشعه ماوراء بنفش؛ اشعه مادون قرمز؛ امواج کوتاه؛ امواج رادیویی و ... می باشد. حرکت نور و تمام تشعشعات الکترومغناطیس به صورت موج می باشد و نور به صورت بسته های انرژی (فوتون) بوده دارای انرژی است ولی فاقد جرم می باشد. طول موج: به فاصله بین قله های امواج متوالی گفته می شود ( $\lambda$ ) و عموماً بر حسب nm (نانومتر) بیان میشود. توان (فرکانس): به تکرار سیکل موج در ثانیه گفته می شود. توان با انرژی نورانی رابطه مستقیم و با طول موج رابطه معکوس دارد.

### طیف سنجی (Spectrometry):

به شاخه ای از علوم برمی گردد که در آن نور، به طول موجهای تشکیل دهنده خود جهت تولید طیف تجزیه می شود. طیف سنجی ابزاری قوی برای بررسیهای کمی و کیفی است. امروزه مفهوم آن وسیعتر شده است و علاوه بر نور مرئی مطالعاتی بر روی دیگر تشعشعات الکترومغناطیس صورت می گیرد. محدوده طول موج مرئی بین 380-750nm می باشد. طیف نور خورشید و نور حاصل از فیلامان تنگستن، طیفی از انرژی نورانی با طول موجهای مختلف می باشد که چشم انسان آن را به صورت نور سفید می بیند. وقتی یک محلول در برابر نور سفید، سبز به نظر می رسد، بدین معنی است که طول موجهای بین 540-580nm از خود عبور می دهد ولی سایر طول موجهای نور را جذب می کند.

### اصول رنگ سنجی یا جذب سنجی:

از روش رنگ سنجی یا جذب سنجی در آزمایشگاههای بالینی و تحقیقاتی استفاده فراوانی می شود. اصول این روش بر مبنای ترکیب ماده مورد اندازه گیری با یک معرف خاص و ایجاد رنگ می باشد که رنگ حاصل اندازه گیری شده و در مقایسه با محلول استاندارد، میزان ماده مورد نظر محاسبه می گردد و اندازه گیری میزان جذب نور، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer) صورت می گیرد.

### جذب انرژی نورانی :

هنگامیکه یک گروه اشعه نورانی با شدت  $I_0$  وارد محلول یک جسم می گردد، سه حالت ممکن است وجود داشته باشد:

- 1) اشعه نورانی بدون هیچگونه جذب نوری از داخل محلول عبور نماید و شدت اشعه خروجی برابر با اشعه ورودی باشد ( $I_0 = I$ ). در نتیجه چنین محلولی را محلول شفاف می نامند.
  - 2) اشعه نورانی به طور کامل توسط محلول جذب گردیده و شدت نور خروجی برابر با صفر باشد ( $I = 0$ ). در نتیجه چنین محلولی را محلول کدر می نامند.
  - 3) فقط قسمتی از اشعه نورانی توسط محلول جذب گردیده و شدت نور خروجی از نور ورودی کمتر باشد ( $I_0 > I$ ). که چنین محلولی برای اشعه مربوطه محلول نیمه شفاف نامیده می شود.
- یک محلول نیمه شفاف مقداری از نور ورودی را جذب و مقداری را عبور می دهد. از نظر رنگ سنجی یا جذب فقط این دسته از محلولها حائز اهمیت می باشند.

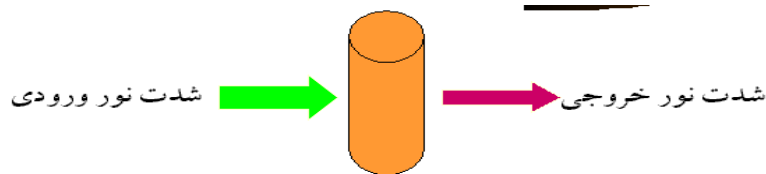
**تعیین مقدار یک ماده :** تعیین مقدار یک ماده از دو روش می توان استفاده نمود:

- 1) تعیین مقدار با استفاده از مقدار نوری که جذب محلول رنگی می شود و به آن جذب (Absorbance) می گویند که اگر طول مسیر عبور نور برابر با یک سانتیمتر باشد ( $L=1\text{cm}$ ) در این صورت به آن دانسیته اپتیک (Optical Density) گفته می شود.
- 2) تعیین مقدار ماده با استفاده از مقدار نوری که از محلول رنگی عبور می نماید و به آن ترانسmittانس (Transmittance) و یا عبور نور می گویند.

### قانون بیر و لامبرت (Beer & Lambert) :

**قانون بیر :** هنگامیکه نور تک رنگی از داخل محلول عبور نماید، میزان نور جذب شده متناسب با غلظت ملکولهایی که در مسیر اشعه نورانی قرار گرفته و نور را جذب می کنند.

**قانون لامبرت :** طبق این قانون، تحت شرایط مساوی، شدت نور خارج شده با افزایش طول مسیری که نور از محلول عبور می کند کاهش می یابد. با استفاده از دو قانون مذکور می توان روابط پایین را نوشت :



$I_o$

$I$

$$I = I_o \cdot 10^{-\epsilon dc}$$

$$\frac{I}{I_o} = 10^{-\epsilon dc}$$

$$OD = A = \log \frac{I_o}{I}$$



$$OD = A = \log \frac{100}{T}$$

$$OD = A = 2 - \log \%T$$

$$\log \frac{I}{I_o} = \log (10^{-\epsilon dc})$$

$$\log \frac{I}{I_o} = -\epsilon dc$$

$$\log \frac{I_o}{I} = \epsilon dc$$

$$OD = A = \epsilon dc$$

$c$  = غلظت ،  $d$  = طول قسمتی از محلول که در مسیر نور قرار گرفته است ،  $\epsilon$  = ضریب جذب یا ضریب خاموشی .

هنگامیکه  $c = 1_M$  ،  $d = 1\text{cm}$  باشد آنگاه  $A$  برابر با  $\epsilon$  و برای یک ترکیب مشخص در طول موج معینی ثابت است. عوامل موثر بر ضریب جذب یک ماده عبارتند از : طول موج نور ، درجه حرارت ، نوع جسم ، نوع حلال و pH .

اگر  $I_o$  شدت نوری که از محلول خارج می شود باشد ،  $\frac{I}{I_o}$  مقدار ترانسmittانس است که با  $T$  نمایش داده می شود. اگر  $I_o$  ،  $100$  در نظر گرفته شود ،  $I$  درصد جذب را نشان می دهد. مقدار  $A$  (جذب) و یا تراکم نوری ( $OD$ ) به صورت زیر بیان می شود:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{T} = 2 - \log \%T$$

انحراف از قانون بیر - لامبرت: اگر غلظت ماده مورد اندازه گیری در محلول، بالا باشد، باعث ایجاد تجمع (aggregation) و در نتیجه باعث خطا در اندازه گیری می گردد، پس باید در این حالت، سنجش آنالیت در محدوده غلظتهای پایین صورت گیرد.

### نکات مورد توجه در رنگ سنجی :

(1) **جدا کردن عوامل مزاحم:** برای تعیین مقدار یک ماده باید سعی کنیم حتی المقدور مواد مزاحم را از محیط آزمایش دور کنیم تا از پیدایش رنگهای بیگانه و مزاحم جلوگیری گردد. برای این منظور در اغلب اندازه گیری ها به کمک ترکیبات مختلف، پروتئین های خون یا پلاسما را رسوب داده و واکنش را بر روی محلول صاف شده انجام می دهند. یا اینکه بعضاً به کمک حلالهای مناسب، ماده مورد اندازه گیری را از سرم جدا می کنند.

(2) **واکنش رنگی:** اکثر ترکیبات موجود در مایعات بیولوژیک در اثر اضافه کردن معرف مناسب ایجاد ترکیب یا کمپلکس رنگی می نماید. برای انتخاب واکنش رنگی 2 نکته را باید در نظر داشت :

الف) خصوصیت واکنش : واکنش باید مخصوص ماده شیمیایی مورد اندازه گیری باشد و با ترکیبات دیگر ایجاد رنگ نکند، به عبارت دیگر معرفی که برای ایجاد ترکیب یا کمپلکس رنگی با ماده مورد اندازه گیری به کار می رود، حتی المقدور باید فقط با ماده مورد اندازه گیری واکنش دهد نه با ترکیبات دیگر موجود در محیط.

ب) حساسیت واکنش : واکنش هایی باید انتخاب نمود که عواملی مانند pH ، حرارت و نور بر آنها بی اثر و یا کم اثر باشند و بتوان آنها را در شرایط ساده ای انجام داد.

### ارتباط طول موجهای مختلف (λ) با رنگ محلول رنگی :

طول موجهای مختلف، تولید رنگهای مختلفی را می نمایند و در اسپکتروفتومتری انتخاب طول موج براساس رنگ محلول رنگی صورت می گیرد. یعنی باید طول موجی را انتخاب نمود که رنگ آن مکمل رنگ محلول باشد. به عنوان مثال اگر یک محلول رنگی داشته باشیم و نوری از آن عبور دهیم مقداری از این نور جذب می شود که این نور جذب شده دارای رنگ مکمل رنگ محلول می باشد که این مقدار بستگی به غلظت محلول رنگی دارد. لذا در دستگاه اسپکتروفتومتری بوسیله فیلتر و یا منشور و ... نور تک رنگ ایجاد می نمایند، تا بتوان غلظت یک محلول رنگی (خاصی) را محاسبه کرد. محلولهای رنگی در رنگ مکمل خود حداکثر جذب نور را دارند و بر حسب همین خاصیت مواد را در طول موجهای (λ) مربوط به خود مورد مطالعه قرار می دهند. و شدت و ضعف این رنگ بستگی به مقدار ماده موجود در محلول دارد.

### محلولهای مورد استفاده در جذب سنجی:

الف - **محلولهای استاندارد (Standard):** در جذب ابتدا باید واکنش رنگی را با محلولهای دارای غلظت معین (محلول St) انجام داده و منحنی تغییرات دانسیته اپتیک (OD) را نسبت به غلظت های مختلف رسم نمود. در صورتیکه منحنی تغییرات خطی باشد (یعنی جذب نوری محلول رنگی از قوانین جذب نوری تبعیت نماید) می توان هنگام اندازه گیری یک ماده در مایع بیولوژیک با روش رنگ سنجی فقط از یک دو محلول استاندارد (استاندارد رقیق و غلیظ) استفاده نموده و مقدار ماده را در مایع بیولوژیک با استفاده از رابطه زیر محاسبه نمود:

$$C_T = \frac{OD_T}{OD_{st}} * C_{st}$$

ب - **محلولهای شاهد (Blank):** محلولی است محتوی تمام مواد بکار برده شده در آزمایش، به جز ماده مورد اندازه گیری. در تعیین مقدار یک ماده در مایعات بیولوژیک، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر باید ابتدا با محلول شاهد، عقریه گالوانومتر را روی عدد صفر در

دستگاههایی که بر حسب OD مدرج شده‌اند و عدد 100 در دستگاهی که بر حسب %T مدرج شده‌اند، میزان نموده و سپس مقدار جذب برای محلولهای تست (t) و استاندارد (st) قرائت نمود.

**ج - محلولهای مجهول (Test):** محلولی است که هدف ما تعیین مقدار یک ماده در آن محلول است. به عبارت دیگر، محلول تست یا مجهول محتوی تمام مواد بکار برده شده در آزمایش است به اضافه مقداری از ماده مورد اندازه گیری که هدف ما تعیین مقدار آن، می باشد. میزان جذب این محلول با میزان جذب محلول استاندارد مقایسه می‌شود. سپس با استفاده از رابطه ذکر شده در بالا می توان غلظت یک ماده را در یک محلول دقیقاً تعیین مقدار نمود.

### دستگاه اسپکتروفتومتر

شامل بخشهای زیر می باشد: منبع نور، موازی ساز (عدسی)، تک فام ساز (منوکروماتور)، گزینشگر طول موج، جایگاه کووت یا سل، سل فتوالکتریک (photocell) یا دتکتور و مانیتور.

#### خصوصیات منبع انرژی:

- 1) منبع انرژی باید پرتو تولید شده اش دارای انرژی کافی باشد تا در مراحل بعد بتواند دتکت شود (مورد سنجش قرار گیرد).
- 2) تولید طیف پیوسته نماید (یعنی حاوی تمام طول موجها باشد).
- 3) پایدار باشد (یعنی قدرت امواج در طول کار تغییر نکند).

#### انواع منبع انرژی:

لامپ تنگستن: که تولید طول موج 320-2500nm را می نماید.  
لامپ هیدروژن یا دوتریوم: تولید طول موج بین 165-375nm می نماید.  
لامپ جیوه ای: تولید اشعه UV (به اضافه مقداری از دامنه مرئی) می نماید.

#### منوکروماتور (تک فام ساز):

تجزیه کننده اشعه نوری می باشد و باعث ایجاد نور تک رنگ می گردد. دارای انواع زیاد می باشد که فیلترها، منشورها، گراتینگ ها (grating) از آن جمله اند. فیلترها منشورها اکنون کاربرد چندانی ندارند. گراتینگ ها یک سری صفحات شیشه ای شفاف اند و یا غیر شیشه ای ممکن است باشند. بوسیله دستگاههای تراش حدود 15000 تا 30000 شیار در هر اینچ بر روی آنها قرار می دهند (حدود 10000 در هر cm). وقتی نور به آنها برخورد می نماید هر کدام از آنها مانند یک منشور عمل می کند و نور را تجزیه می کند.

#### سلول نمونه یا کووت (Sample cell):

خصوصیاتی که یک کووت باید داشته باشد به شرح زیر است:

- 1) باید نور تابشی را جذب نکند.
- 2) برای ناحیه ماوراءبنفش (UV) باید جنس آن از کوارتز یا سیلیکا باشد (برای امواج مرئی از کووت شیشه ای می توان استفاده کرد). قطر آن بستگی به دستگاه دارد ولی معمولاً 1cm است و شکل آن عموماً استوانه ای یا مکعبی می باشد.

### دکتور (Detector):

برای اندازه گیری شدت امواج بکار می روند و دارای خواص فتوالکتریک اند که انرژی نورانی را به الکتریکی تبدیل می کنند.

### خصوصیات دکتور:

- (1) حساس به دامنه وسیعی از طول موجها باشد.
- (2) حساسیت نسبت به تابشهای کم انرژی (یعنی اگر I کم باشد باید به اندازه کافی حساس باشد).
- (3) عکس العمل آنی نسبت به تشعشعهای مختلف داشته باشد (سریع عمل کنند).
- (4) عکس العمل الکتریکی که در دکتور ظاهر می شود مستقیماً متناسب با انرژی تابش شده باشد.

### انواع اسپکتروفتومتر:

- (1) اسپکتروفتومتر تک کووتی (Single beam): یک Sample cell دارد و یک پرتو به نمونه می تابد.
- (2) اسپکتروفتومتر دو کووتی (Double beam): یکی از کووتها، مربوط به بلانک و دیگری مربوط به Sample می باشد.

### اهداف :

- (1) تعیین طول موج مناسب (طول موج ماکزیمم) برای اندازه گیری مقدار یک ماده .
- (2) رسم منحنی استاندارد ماده مورد اندازه گیری یا اثبات قانون بیر و لامبرت.